UQAC
Université du Québec
à Chicoutimi

DESS DE COSMETOLOGIE

MONOGRAPHIE

SODIUM BENZOATE ET MIT

Louis-Nicolas Gombault

Présentée le 10/12/2014

Composition du Jury

LIONEL RIPOLL	Professeur invité	Rapporteur
ANDRE PICHETTE	Professeur	Examinateur
JEAN LEGAULT	Professeur	Examinateur

TABLE DES MATIERES

Introduction **5**

1. Benzoate de sodium et MIT **6**

1.1. Identité, propriétés physiques et chimiques **6**

1.2. Utilisation **7**

1.3. Ce que l'on cherche sur le web **8**

1.4. Ce que le web nous explique **9**

2. Réglementation **11**

2.1. Européenne **11**

2.2. Canadienne **13**

3. Mécanisme d'action **15**

3.1. Acide benzoïque / sodium benzoate, historique **15**

3.2. MIT **16**

4. Moyens d'obtention **17**

4.1. Sources naturels de l'acide benzoïque **17**

4.2. Source chimique du benzoate de sodium **17**

4.3. Synthèse chimique des thiazolinones **17**

5. Caractérisation **20**

5.1. Identification Acide Benzoïque [Directive 95/32/CE] **20**

5.2. Dosage de l'acide benzoïque **22**

5.3. MI/MCI **23**

6. Toxicité, évaluation des risques **24**

6.1. Benzoate de sodium **24**

6.2. MIT **25**

6.3. Génotoxicité et sodium benzoate **26**

6.4. Hypersensibilité et MIT **30**

6.4.1. Dermatite de contact, Définition 30

6.4.2. Diagnostique 31

6.4.3. Epidémiologie de l'allergie de contact 32

7. Substitution **35**

Conclusion **36**

Bibliographie **37**

TABLE DES FIGURES

- *Figure 1 :* Voie métabolique de la catégorie des alcools benzylique _____ 7
- *Figure 2 :* Synthèse des isothiazolinones _____ 16
- *Figure 3 :* Réactions positives au patch test (a et b = +, c=++, d=+++)_____ 29
- *Figure 4 :* réaction positive au MI seul par patch test _____ 29
- *Figure 5 :* Réactions positives aux patch tests à la MCI/MI et MI, IS, Isothiazolinone _____ 31

LISTE DES TABLEAUX

- *Tableau 1 :* identité, propriétés physiques et chimiques_____ 6
- *Tableau 2 :* Entries 39 and 57 of Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products are replaced by the following _____ 10
- *Tableau 3 :* Historique, usage courant et concentration d'utilisation du MI _____ 11
- *Tableau 4 :* Effet du pH sur la dissociation de l'acide benzoïque _____ 14
- *Tableau 5 : Skin irritaiton and sensitization studies*_____ *24*
- *Tableau 6 :* Aberrations chromosomiques sur des cultures des lymphocytes humains traitées avec du benzoate de sodium _____ 25
- *Tableau 7 :* Fréquence d'échange de chromatides sœurs dans des cultures de lymphocytes humains traitées avec du Benzoate de sodium _____ 26
- *Tableau 8 :* Micronoyaux dans les cultures humaines de lymphocytes traitées au benzoate de sodium_____ 26
- *Tableau 9 :* ADN dommages causés par le SB chez des lymphocytes humains isolés _____ 27
- *Tableau 10 :* Augmentation du taux de sensibilisation et taux de sensibilisation à la MI dans 5 pays européens _____ 30

Introduction

Avec le développement de nouveaux procédés et l'augmentation de la production, des plats cuisinés notamment, les additifs alimentaires sont devenus une pratique de plus en plus importante dans la technologie alimentaire moderne. Ces conservateurs sont ajoutés afin de stopper, ou du moins réduire la perte nutritionnelle des aliments due aux microorganismes. On observe aujourd'hui une hausse incroyable de l'utilisation de ces conservateurs dans l'alimentaire sur la dernière décennie. En effet il a été estimé qu'aujourd'hui chaque personne consomme en moyenne une quantité comprise entre 8 et 10 lbs de conservateurs alimentaires par année (et même parfois plus). **[1]** (N. Zengin)

En effet, le benzoate de sodium et la méthylisothiazolinone sont 2 conservateurs fréquemment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, mais aussi cosmétique et pharmaceutique.

Selon la directive européenne n° 76/768/CEE du 27 juillet 1976 modifiée, les agents conservateurs : « sont des substances ajoutées comme ingrédients à des produits cosmétiques principalement pour inhiber le développement de micro-organismes dans ces produits »

Que ce soit les produits cosmétiques, les nettoyants ou les produits pharmaceutiques, la plupart contiennent de l'eau. Cette eau nécessite une attention particulière car elle est la cible de microorganismes qui vont à l'encontre de la sécurité du produit et diminue sa durée de vie. Parmi la multitude de conservateurs présents sur le marché, les plus fréquemment retrouvés sont le méthylisothiazolinone (MIT), le méthylchloroisothiazolinone (MCI), l'alcool benzylique (BA), le benzoate de sodium (SB) et les parabens. **[2]** (Irena Baranowska)

Comme nombre d'autres conservateurs, ceux-ci reviennent régulièrement à la Une de l'actualité cosmétique. Depuis plusieurs années, ils font l'objet d'inquiétudes et de messages d'alertes lancés par les organisations de dermatologues ou les autorités sanitaires du fait de leur fort potentiel allergisant. Ils sont aujourd'hui dans la ligne de mire des instances réglementaires européennes, avec à la clé, une limitation de leur utilisation, voire une interdiction dans certains produits

A partir de différentes études, nous allons étudier avec attention les 2 conservateurs que sont le MIT et le SB pour leurs utilisations dans l'industrie cosmétique principalement. Durant leurs premières années d'utilisations, l'absence de connaissance précise les concernant a permis leurs mises sur le marché, mais aujourd'hui et depuis plusieurs années, la multiplication d'articles démontrant l'effet néfaste remet tout en question. Nous faisons le point.

1. Benzoate de sodium et MIT

1.1.Identité, propriétés physiques et chimiques

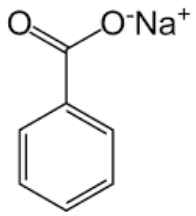
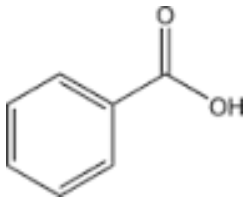
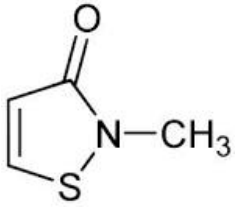
NOM	BENZOATE NA	ACIDE BENZOÏQUE	MI
Structure			
N° CAS	532-32-1	65-85-0	2682-20-4
Formule brute	C7H502Na	C7H6O2	C4H5NOS
Synonyme	Benzoic acid, sodium salt	Benzenecarboxylic acid, phenyl carboxylic acid	2-Méthyl-4-isothiazolin-3-one
Poids moléculaire (g/M)	144,11	122,13	115,2
Apparence	Solide blanc		Noir-Marron
Pt de fusion	330,6 °C	122 °C	48 - 49,5 °C
Pt d'ébullition	464,9 °C	249 °C	236 °C
Solubilité à 20°C (eau)	550-630 g/L	2,9 g/L	≥ 100 g/100 ml de solvant
Soluble dans	Eau, éthanol, méthanol et éthylène glycol	Ethanol, benzène et acétone	Eau, acétonitrile, méthanol
pKa	7,5	4,19	2,58
Origine	Synthétique	naturel	Chimique

Tableau 2 : identité, propriétés physiques et chimiques

L'Alcool benzylique, l'acide benzoïque et ses sels de sodium et potassium peuvent être considéré comme une seule et même catégorie car ils sont rapidement métabolisés et excrétés via une voie commune dans les 24 h.

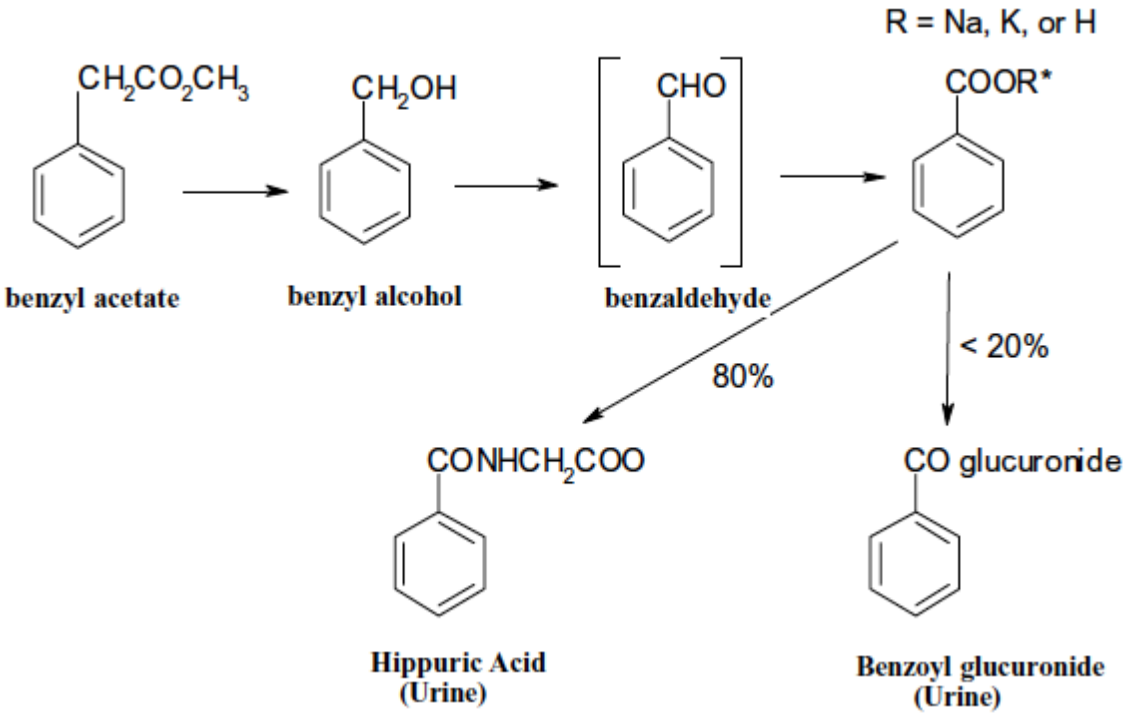


Figure 1 : Voie métabolique de la catégorie des alcools benzylique.

1.2.Utilisation

Le système de lettre E pour les additifs alimentaires a été présenté dans les années 1960 et avait pour but de rassurer les consommateurs, notamment sur le fait que les additifs permis étaient sûrs. Ensuite, dans les années 1980, la fourniture de la liste complète d'ingrédient devient alors obligatoire et pour la première fois les fabricants pouvaient utiliser le nom et le numéro de l'additif dans cette liste. A partir d'une utilisation initiale de E nombre dans la liste d'ingrédient, les fabricants ont alors augmenté et étendue fortement cette utilisation. **[3]** (M et Inglehurst Foods Ltd)

En effet, le benzoate de sodium, retrouvé sous l'appellation E211, est un ester de l'acide benzoïque et prolonge la conservation des boissons gazeuses comme les sodas mais aussi des aliments tels que les légumes en conserve et d'autres aliments.

Il est également utilisé pour conserver les produits cosmétiques et pharmaceutiques.

La méthylisothiazolinone (MIT) est, quant à elle, un biocide et conservateur qui permet de lutter efficacement contre la prolifération des bactéries et des champignons. C'est une substance bon marché qui ne nécessite pas d'être présente en grande quantité pour être efficace. La méthylisothiazolinone (MI) a été utilisée en association avec la méthylchloroisothiazolinone (MCI) dans les produits cosmétiques et industriels, dès les années 1980. **[4]** (Maria Antonieta Rios Scherrer)

Aussi connu sous le nom d'Euxyl K 100 ou Katon CG, l'association a donc été introduite aux USA comme conservateur. C'est un mélange de méthylchloroisothiazolinone et de méthylisothiazolinone avec un ratio en poids de 3 :1. Il est très utilisé dans des savons, nettoyants, crème de protection et dans de nombreux secteurs professionnels comme l'agriculture (pesticides), industrie (peinture, imprimerie, photographie et radiologie…)

1.3.Ce que l'on cherche sur le web

Les questions que les gens posent sur internet à propos des conservateurs :

C'est quoi ?

Suis-je concerné ?

Quelle utilité ?

« Sans conservateur » ?

Résultats d'une recherche internet sur le MIT :

- Le MIT, nouveau conservateur ?
- Cosmétiques et produits ménagers : MIT, un conservateur à bannir ?
- Un conservateur, le MIT, bientôt interdit dans les cosmétiques ?
- Le MIT réhabilitera-t-elle les parabens ?

1.4.Ce que le web nous explique

« Méthylisothiazolinone ne vous dit rien ? »

→ « C'est pourtant le MI qui se cache bien souvent derrière la mention « sans parabens ». Certains parabens étant considérés comme des perturbateurs endocriniens, le recours à des conservateurs de la famille des isothiazolinones se multiplie. C'est le cas du MI, de plus en plus présent dans les produits de consommation : cosmétiques, produits de nettoyage notamment. Le potentiel allergène de ce composé invite pourtant à la prudence. Dans de nombreux pays, des mises en garde se multiplient à son sujet et la progression des réactions à ce composé est problématique. »

« Sans conservateur ? »

→ Selon un communiqué de l'Afssaps, "la DGCCRF a relevé la pratique de certains fabricants consistant à mettre en avant l'absence d'un conservateur particulier, alors même que le produit en contient d'autres. Une telle pratique, dès lors qu'elle consiste à délivrer une information délibérément incomplète au consommateur, pourrait être considérée comme susceptible de l'induire en erreur sur la composition réelle du produit".

Ainsi, certains fabricants utilisent des substituts non reconnus ou non classés dans la catégorie des conservateurs mais qui ont une action de conservation. C'est le cas de l'alcool ou des huiles essentielles.

On retrouve également le sodium benzoate dans de nombreux médicaments en raison de ses propriétés (antiseptique, antifongique, expectorant).

« Nouveau ? »

→ La méthylisothiazolinone figure sur la liste des conservateurs autorisés en cosmétique par la réglementation européenne (Annexe VI de la directive cosmétique) depuis 1976. Elle est également utilisée dans le monde entier depuis plusieurs dizaines d'années. En Europe, sa concentration maximale dans les produits de cosmétiques est limitée à 0,01 % quand elle est utilisée seule (voir partie RÉGLEMENTATION)

2. Réglementation

2.1. Européenne

2.1.1. Benzoate de sodium

Le benzoate de sodium peut être utilisé dans tous les types de cosmétiques (List Of preservatives allowed in cosmetics products, European Commission, Health and consumers) mais a des pourcentages différents en fonction de si le produit est (Annex VI to Directive 76/768/EEC) :

- Un produit à rincer (sauf les produits bucco-dentaires). Dans ce cas la concentration maximale autorisée est de 2,5 % pour les préparations prêtes à l'emploi (produits finis)
- Un produits bucco-dentaires : 1,7 %
- Un produits sans rinçage : 0,5 %

La SCCP a statué sur l'utilisation de l'acide benzoïque et du benzoate de sodium. Ces conservateurs peuvent être utilisés avec sécurité pour conserver les produits cosmétiques dans ces concentrations. **[5]** (PRODUCTS)

2.1.2. MIT

Pour assurer la sécurité des produits cosmétiques, la commission Européenne a adopté la régulation (EU) N° 1003/2014 qui restreint l'usage du méthylchloroisothiazolinone (MCI) et méthylisothiazolinone (MI) dans les produits cosmétiques. Mais l'utilisation du mélange est incompatible avec l'usage du MI seul dans le même produit. (*OPINION SCCS/1238/09, on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one, 8 december 2009*) **[6]**

	Substance Identification				Conditions	
Reference number	Chemical name/INN	Name of Common Ingredients Glossary	CAS number	EC number	Product type, Body parts	Maximum concentration in ready for use preparation
a	b	c	d	e	f	g
'39	Mixture of 5-Chloro-2-methyl-isothiazol-3 (2H)-one and 2-methyli-sothiazol-3(2H)-one	Methylchloroisothiazoli-none (and) Methylisothia-zolinone (1)	26172-55-4, 2682-20-4, 55965-84-9	247-500-7, 220-239-6	Rinse-off products	0,0015 % (of a mixture in the ratio 3:1 of 5-chloro-2-methylisothiazol 3(2H)-one and 2-methyli-sothiazol-3 (2H)-one)'
'57	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	Methylisothiazolinone (2)	2682-20-4	220-239-6		0,01 %'

Tableau 2 : Entries 39 and 57 of Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products are replaced by the following

Quelques dates clés :

En 2008, le CIR Expert panel a conclu que le MI, à une concentration de 100 ppm est sécuritaire pour l'utilisation cosmétique.

En 2010, Le rapport de sécurité est publié dans le journal international de Toxicology.

Mars 2013, réévaluation de la fiche sécurité par le panel d'expert aux vues d'une plus forte fréquence que prévu de réaction allergique. Encourage à approfondir les études. (*Amended Safety Assessment of Methylisothiazolinone as Used in Cosmetics, 18 March 2014 – Cosmetic Ingredient Review*) **[7]**

Le SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) a publié en décembre 2013 à la Commission européenne un avis sur l'utilisation de la MI dans les cosmétiques. Il apparaît au vu de la littérature que la MI à la concentration de 100 ppm dans les produits cosmétiques non rincés (y compris les « lingettes humides ») n'est pas sûre pour le consommateur (risque de déclenchement et d'induction d'un eczéma de contact allergique) et que la MI devrait être supprimée dans ce type de produits cosmétiques. Concernant les produits cosmétiques rincés, une concentration maximale de 15 ppm de MI (identique à celle autorisée pour le mélange MCI/MI) pourrait être considérée comme sûre pour le consommateur du point de vue de l'induction d'une l'allergie de contact, mais aucune information n'est disponible sur le risque de déclenchement d'un eczéma chez les malades déjà sensibilisés. Une consultation est ouverte pendant 3 mois et débouchera sur une réglementation de la MI au niveau européen. Suite à l'ouverture de cette consultation par le SCCS, Cosmetics Europe a déjà émis la recommandation à ses membres fabricants de cosmétiques de supprimer la MI dans les produits non rincés, y compris dans les lingettes cosmétiques sans attendre l'intervention réglementaire et la modification du règlement cosmétique. **[8]**

	*# of Uses**		*Max Conc of Use (%)*	
Data Year	**2007**	**2013**	**2007**	**2013**
Totals[1]	**1125**	**3339**	**4×10^{-6}-0.01**	**3.5×10^{-8}-0.011**
Duration of Use				
Leave-On	236	726	0.002-0.01	3.5×10^{-8}-0.011
Rinse-Off	807	2477	4.0×10^{-6}-0.01	2.5×10^{-7}-0.01
Diluted for (Bath) Use	82	136	NR	0.0002-0.01

Tableau 3 : Historique, usage courant et concentration d'utilisation du MI

La table présente l'historique et les produits formulés avec du MI.

RÈGLEMENT (UE) No 1003/2014 DE LA COMMISSION du 18 septembre 2014 :

Le CSSC a conclu que le mélange méthylchloroisothiazolinone (et) méthylisothiazolinone dans un rapport 3:1 ne présentait pas de risque pour la santé des consommateurs lorsqu'il est utilisé comme agent conservateur jusqu'à une concentration maximale autorisée de 0,0015 % dans les produits cosmétiques à rincer, si on exclut son potentiel de sensibilisation cutanée. Selon le CSSC, les phénomènes d'induction et de déclenchement seraient moins susceptibles d'advenir avec un produit à rincer qu'avec un produit sans rinçage présentant la même concentration.

Il y a lieu de différer l'application des restrictions susmentionnées afin de permettre au secteur d'apporter les modifications nécessaires aux formulations des produits. En particulier, après l'entrée en

vigueur du présent règlement, les entreprises devraient bénéficier d'un délai de neuf mois pour mettre sur le marché des produits conformes et de dix-huit mois pour retirer les produits non conformes du marché.

2.2. Canadienne

Qu'est-ce que la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one? (Santé Canada)

Le composé 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one est une nouvelle matière active proposée pour utilisation comme agent de préservation dans des contenants. Il est destiné à prévenir l'altération bactérienne lorsqu'il est ajouté aux formulations de micelles polymériques, boues minérales, peintures, détergents, agents nettoyants et produits à polir, de même qu'en tant qu'agent de préservation à ajouter aux fluides métallurgiques. La matière active est un biocide à large spectre qui agit en perturbant le métabolisme microbien. Même si l'utilisation de la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one en association avec de la 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one est déjà homologuée en tant que produit du système intégré pour la préservation en contenant d'un certain nombre de matériaux, la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one utilisée seule constitue une nouvelle matière active.

Les utilisations approuvées de la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one peuvent-elles affecter la santé humaine?

Il est peu probable que la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one nuise à la santé si elle est utilisée conformément au mode d'emploi figurant sur l'étiquette. **[9]**

2.2.1. Benzoate de sodium

Nom de la BDIPSN	Benzoate de sodium
Référence	USP (*The United States Pharmacopeia 31)

Dans les produits oraux de réhydratation, cet ingrédient est acceptable comme source de Sodium. Le sodium est un électrolyte et non pas un nutriment. Comme ingrédient médicinal le sodium ne contribue pas à maintenir une bonne santé puisque il existe probablement un excédent de sodium venant de l'alimentation et non pas une carence. L'innocuité et l'efficacité du Benzoate de sodium comme source de sodium doivent être évaluées selon les conditions d'utilisation recommandées.

Rôles :

- MEDICINAL : Classifié comme PSN sous Annexe 1, article 2 (un isolat) du Règlement sur les produits de santé naturels
  Référence : NHPD, nom : DPSN. **[10]**

- NON MEDICINAL : Agent de conservation antimicrobien, exhausteur de goût, lubrifiant.

2.2.2. MIT

Les niveaux de concentration autorisés pour la MI sont plus élevés que pour le mélange MCI/MI. La concentration maximale autorisée de la MI dans les produits cosmétiques, rincés ou non, est de 100 ppm en Europe et aux États-Unis, correspondant à environ 25 fois le niveau autorisé pour le mélange MCI/MI. Dans le cas des produits industriels, il n'existe pas de limite maximale autorisée de concentration de MI, mais seulement une nécessité d'étiquetage pour des concentrations supérieures à 10 000 ppm dans le produit fini ! **[11]**

3. Mécanisme d'action

3.1.Acide benzoïque / sodium benzoate, historique

C'est la molécule indissociée de l'acide benzoïque qui est responsable de l'activité antimicrobienne. Gabel (**1921**) est un des premiers à démontrer que l'acide benzoïque est efficace en milieu acide à hauteur de 0,1 %, 0,2 % en milieu neutre mais inactif en milieu basique. Des résultats similaires ont été reportés pour les fungi et levures (Cruess et Richert, **1929**).

Rahn et Conn (**1944**) ont observé l'effet antimicrobien de l'acide benzoïque.

Webb (**1966)** montre que l'acide benzoïque et le sodium benzoate peuvent aussi inhiber les enzymes spécifiques dans la cellule. Par exemple, chez beaucoup de bactéries et levures, les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide acétique et la phosphorylation oxydative peuvent être inhibées.

En 1973, Freeze et Al., lancent l'hypothèse que l'acide benzoïque inhibe ou tue les microorganismes en interférant avec la perméabilité membranaire entrainant des problèmes dans le transport et la phosphorylation oxydative. Ils montrent aussi que le benzoate inhibe l'assimilation d'acides aminés chez *Penicillium chrysogenum*.

En 1979, Harvath montre que le benzoate sert aussi de piégeur de radicaux libres, comme inhibiteur de la D-amino acide oxydase (Quay et Massay, **1977**)

En 1984, Salmond et al., observent les effets des acides organiques comme conservateurs sur la croissance et le pH intracellulaire d'E.coli. Ils suggèrent que le potentiel conservateur des acides, comme l'acide benzoïque, provient de leur capacité spécifique à réduire le pH intracellulaire.

L'effet de l'acide benzoïque a été observé chez les levures du genre Z.bailii résistantes aux conservateurs (Warth, **1991**). A des concentrations de 4 mM, la fermentation était stimulée et une quantité faible de benzoate était accumulé. Proche de la CMI (10mM), la fermentation est inhibée, la quantité d'ATP diminue et le benzoate accumulé à plus grande quantité. L'auteur a alors conclu que l'action première de l'acide benzoïque chez Z.bailii était de causer une perte générale de l'énergie (par manque d'ATP).

Burlini et Al (**1993**) ont pré-incubé des cellules de S.cerevisiae avec du benzoate à un pH extracellulaire de 6,8, puis ajouté du glucose. Les résultats ont montré une diminution de la consommation de glucose. Le niveau de croissance est réduit avec le conservateur.

Cheng et piper (**1994**) montrent que l'acide benzoïque affecte la réponse inflammatoire et la thermotolérance de S.cerevisiae et que cet effet est dépendant du pH. Les auteurs ont reporté que ce conservateur est parmi les premiers composés à montrer une action en tant qu'inhibiteur sélectif de l'expression des protéines induites par la chaleur chez les levures.

En 1999, Lambert et Stratford ont démontré les points suivants : la consommation théorique d'ATP par la pompe à proton peut être directement corrélé avec la réduction du rendement cellulaire ; les cellules microbiennes peuvent pomper les protons et augmenter le pH interne, en dépit d'un influx plus important de conservateur. **[5bis]**

pH	Acide indissocié (%)
3	93,5
4	59,3
5	12,8
6	1,44
7	0,144
pK	4,19

Tableau 4 : Effet du pH sur la dissociation de l'acide benzoïque

Source : Baird-Parker (1980)

Les acides organiques déséquilibrent le gradient osmotique à travers la membrane cytoplasmique.

3.2. MIT

Le composé 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one prévient la croissance des bactéries, levures et champignons en perturbant leur activité métabolique. Il inhibe l'activité des enzymes essentielles au cycle de Krebs, ce qui rend les microbes incapables de générer l'énergie dont ils ont besoin pour le maintien de leurs fonctions vitales.

La famille des isothiazolinones regroupe des substances chimiques apparentées dotées de propriétés antimicrobiennes à large spectre. Ce sont des composés électrophiles qui se lient aux groupements thiols des protéines et qui inhibent l'activité des enzymes essentielles à la respiration et à la production d'énergie. L'irritation et la sensibilisation cutanées sont des observations toxicologiques couramment liées aux isothiazolinones. [**12**]

4. Moyens d'obtention

4.1.Sources naturels de l'acide benzoïque

Malgré l'importance de l'acide benzoïque comme précurseur de métabolites primaires et secondaires, la biosynthèse chez les plantes n'a pas encore était entièrement élucidée.

L'acide benzoïque (BA) et ses dérivées sont des éléments structurels importants dans un grand nombre de produits naturels jouant ainsi beaucoup de rôles de valeur dans le métabolisme des plantes. Ces composés exécutent non seulement des fonctions critiques dans la santé de la plante (par exemple, comme des régulateurs de croissance, des composés de défense, l'attraction du pollinisateur) mais sont aussi largement utilisés comme des conservateurs et des exhausteurs de goût, analgésiques, antiseptiques et enfin un rôle dans le stockage alimentaire pour des synthèses chimiques. Malgré sa structure simple et la distribution répandue, la compréhension des voies biochimiques menant à la formation BA reste incomplète. **[13]**, **[14]**

4.2.Source chimique du benzoate de sodium

Le benzoate de sodium est le benzoate de soude chimique (C7H5NaO2), produit par neutralisation d'acide benzoïque avec du bicarbonate de sodium, du carbonate de sodium, ou de l'hydroxyde de sodium. Ce sel n'existe pas à l'état naturel

Méthodes d'obtention du benzoate de sodium par synthèse organique Industriellement, des procédés de chimie organique sont utilisés pour synthétiser l'acide benzoïque. Trois procédés sont principalement employés :

- Obtention de l'anhydride phtalique par oxydation de naphtalène. Un catalyseur est nécessaire : l'oxyde de vanadium. L'acide benzoïque est ensuite produit par décarboxylation de l'anhydride phtalique.
- Obtention d'acide benzoïque par oxydation de toluène en présence d'acide nitrique.
- Obtention d'acide benzoïque par hydrolyse du trichlorobenzène.

Le benzoate de sodium est finalement obtenu par une réaction acido-basique entre l'acide benzoïque et l'hydroxyde de sodium, ayant pour formule chimique NaOH. L'hydroxyde de sodium est appelé couramment soude.

4.3. Synthèse chimique des thiazolinones

Une synthèse avec introduction d'un marquage au carbone 13 au niveau du carbone C4 de MI et MCI a été développée précédemment lors d'études visant à déterminer la réactivité de ces 2 molécules séparément vis-à-vis de différents peptides modèles. Cette synthèse peut évidemment être reproduite en série non marquée.

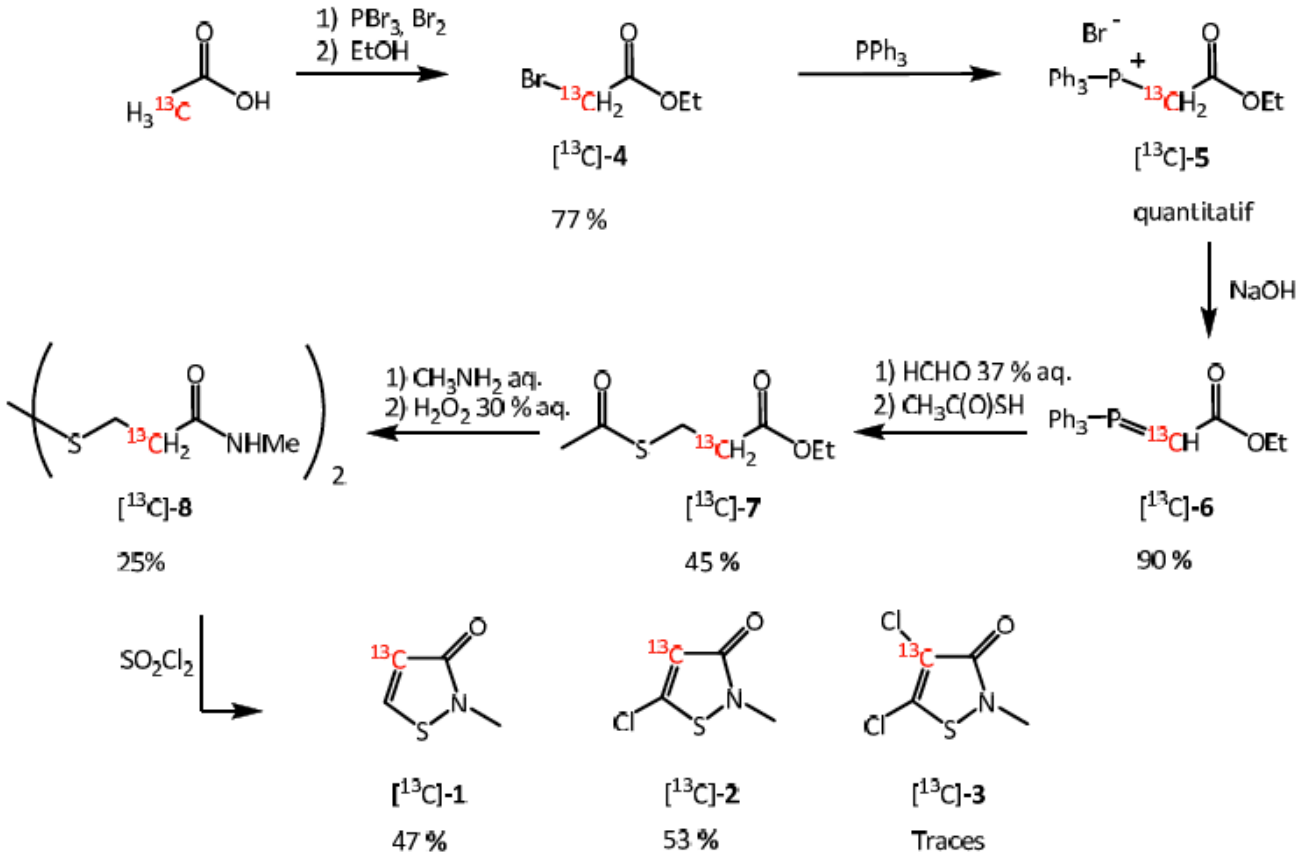


Figure 2 : Synthèse des isothiazolinones

La première étape de cette synthèse consiste en une réaction d'Hell-Volhard-Zelinsky sur l'acide acétique marqué au carbone 13 sur la position 2, suivie d'une estérification pour former le 2-13C-bromacétate d'éthyle 13C-4 avec un rendement de 77%. Ce composé est ensuite traité par de la triphénylphosphine dans de l'acétate d'éthyle pour former quantitativement le bromure de 1-13C-(2-éthoxy-2-oxoéthyl)triphénylphosphonium13C-5. Le composé déprotoné obtenue en milieu basique avec un rendement de 90% subit alors une réaction de Wittig en présence de formaldéhyde aqueux, puis l'acrylate d'éthyle formé est mis en réaction avec l'acide thioacétique. Il en résulte la formation du 2-13C-3-(acetylthio)-propanoate d'éthyle13C-7, obtenu avec un rendement de 30 %. L'ajout de méthanamine sur 13C-7 permet non seulement la conversion de la fonction ester en fonction amide mais également l'obtention d'une fonction d'une fonction thiol par coupure au niveau du groupement thioester. La présence ultérieure de peroxyde d'hydrogène dans le milieu permet l'oxydation de la fonction thiol et la formation d'une liaison disulfure. Le 13C-8 est ainsi obtenu avec un rendement de 25 %. La dernière étape de cette synthèse consiste en une fermeture hétérocyclique oxydante de 13C-8 en présence de chlorure de sulfuryle. La proportion des différentes isothiazolinones obtenu dépend directement de la quantité d'agent de chloration utilisée ainsi que du temps de réaction. Il est ainsi possible de contrôler ces conditions réactionnelles afin de n'obtenir que les isothiazolinones souhaitées

avec des rendements avoisinant les 50 % pour chacune d'entre elles. Le rendement globale de cette synthèse est de 2% pour 13C-1 ainsi que pour 13C-2. **[15]** (Lang, Evaluation du pouvoir allergisant de mélanges complexes : étude de la réactivité de molécules sensibilisantes en mélanges envers des peptides nucléophiles.)

5. Caractérisation

La caractérisation des conservateurs est importante, que ce soit en cosmétique ou en pharmaceutique, non seulement pour le contrôle qualité produit, mais aussi pour le nombre d'allergie dont les conservateurs sont responsables. C'est pourquoi les organismes réglementaires limitent et contrôlent la quantité dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques pour augmenter la sureté d'utilisation. **[16]** (The determination of preservatives in cosmetics)

Celle-ci, en tant que directive, laisse toutefois le soin aux Etats membres de mettre en place les dispositions législatives, règlementaires et administratives nécessaires, notamment la vérification, par des contrôles officiels, de la bonne application des méthodes qu'elle décrit.

Les teneurs en acide benzoïque, en acide 4-hydroxybenzoïque, en acide sorbique et en acide salicylique déterminées par cette méthode sont exprimées en pourcentage de masse des acides libres.

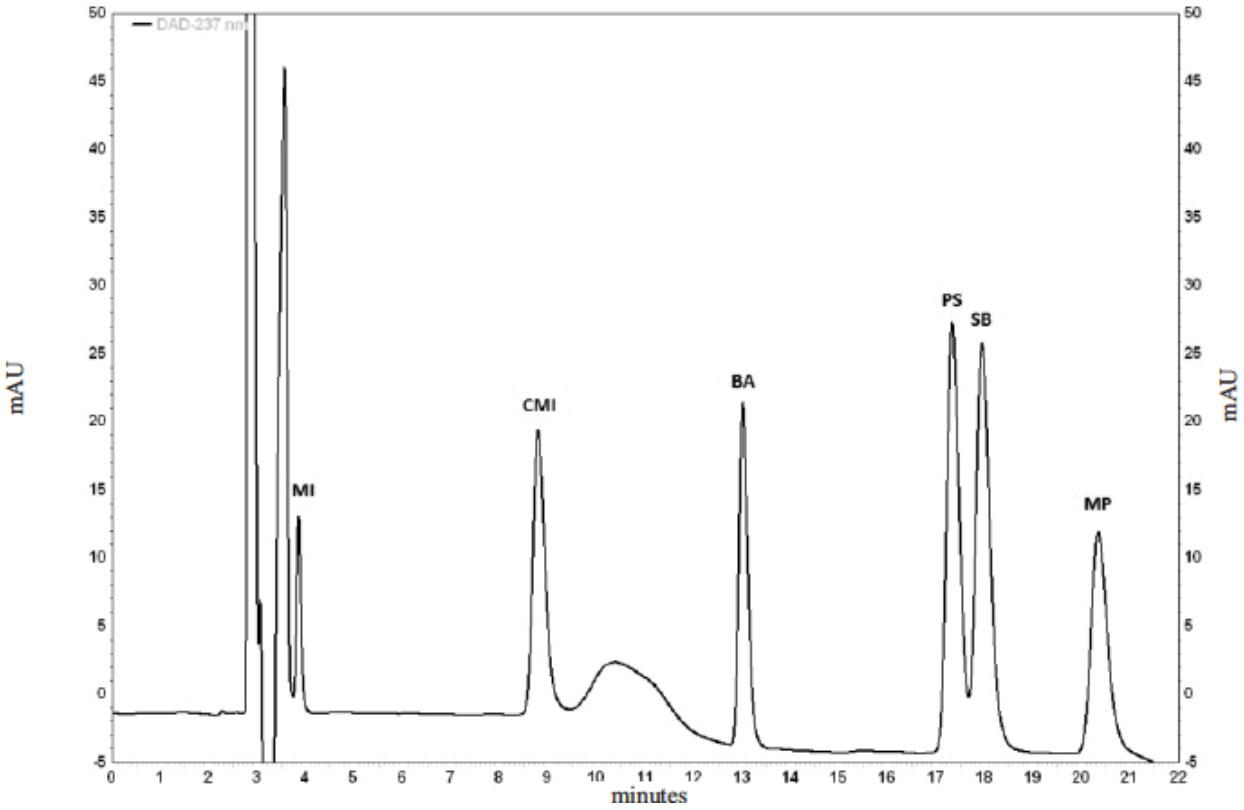


Figure : Chromatogramme de différents standards. (MI : Methylisothiazolinone ; BA : Benzoate de sodium)

5.1.Identification Acide Benzoïque [Directive 95/32/CE]

5.1.1. Principe

Après extraction acide/base des conservateurs, l'extrait obtenu est analysé par chromatographie sur couche mince avec dérivation sur plaque. En fonction des résultats, l'identification est confirmée par chromatographie en phase liquide à haute performance. **[17]**

5.1.2. Préparation de l'échantillon

Peser environ 1 g d'échantillon dans un tube de verre de 50 ml à bouchon à vis. Ajouter quatre gouttes d'acide chlorhydrique 4 M et 40 ml d'acétone. Pour les produits fortement basiques tels que les savons de toilette, il convient d'ajouter 20 gouttes d'acide chlorhydrique 4 M. Vérifier que le pH est d'environ 2 à l'aide du papier indicateur.
Fermer le tube et agiter vigoureusement pendant une minute.
Le cas échéant, faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase acétone en chauffant doucement le mélange à 60 °C afin de faire fondre la phase lipidique.
Laisser refroidir la solution à température ambiante et filtrer sur papier filtre dans une fiole conique.
Transférer 20 ml du filtrat dans une fiole conique de 200 ml, ajouter 20 ml d'eau et mélanger.
Ajuster le pH du mélange à environ 10 à l'aide d'hydroxyde de potassium 4 M. Mesurer le pH à l'aide du papier indicateur.

Ajouter 1 g de chlorure de calcium et agiter vigoureusement. Filtrer sur papier filtre dans une ampoule à décanter de 250 ml contenant 75 ml de diéthyle oxyde et agiter vigoureusement pendant une minute. Laisser décanter puis récupérer la couche aqueuse dans une fiole conique de 250 ml. Éliminer la couche d'éther. À l'aide du papier indicateur, ajuster le pH de la solution aqueuse à environ 2, au moyen d'acide chlorhydrique 4 M.
Ajouter ensuite 10 ml de diéthyle oxyde, boucher la fiole et agiter ensuite 10 ml de diéthyle oxyde, boucher la fiole et agiter vigoureusement pendant une minute. Laisser décanter puis transférer la couche d'éther dans un évaporateur rotatif.
Éliminer la couche aqueuse.
Évaporer la couche d'éther presque à siccité et dissoudre le résidu dans 1 ml de diéthyle oxyde. Transférer la solution obtenue dans un flacon échantillon.

5.1.3. Chromatographie sur couche mince

Pour chacun des solutions témoins et des échantillons à chromatographier, appliquer une solution de carbonate de lithium à l'aide d'une seringue à intervalles réguliers le long de la ligne de dépôt dans la zone de concentration d'une plaque de chromatographie sur couche mince et sécher dans un courant d'air froid.
Placer une plaque pour CCM sur une plaque chauffante portée à 40 °C, afin de maintenir les taches aussi petites que possible. À l'aide d'une microseringue, appliquer 10 /x1 de chaque solution témoin et de la solution échantillon sur la ligne de dépôt de la plaque, exactement sur les taches de solution de carbonate de lithium.
Appliquer enfin environ 15 ul de réactif de dérivation (solution d'alpha-bromo-2acétonaphtone) également exactement sur les taches de solutions témoins et d'échantillon ainsi que de solution Li2CO3.
Chauffer la plaque de chromatographie pendant 45 minutes dans une étuve à 80 °C.
Après refroidissement, développer la plaque dans une cuve préalablement saturée pendant 15 minutes (sans l'aide d'une garniture de papier filtre) avec un solvant d'élution toluène/acétone jusqu'à ce que le front de solvant ait atteint une distance de 15 cm (80 minutes environ).
Sécher la plaque dans un courant d'air froid et examiner à la lumière ultra-violette les taches obtenues. Afin de renforcer la fluorescence des taches les moins visibles, la plaque peut être plongée dans un bain de paraffine liquide/n-hexane

5.2. Dosage de l'acide benzoïque

5.2.1. Principe

Après acidification, l'échantillon est extrait à l'aide d'un mélange d'eau et d'éthanol. Après filtration, des conservateurs sont dosés par chromatographie en phase liquide à haute performance

5.2.2. Préparation de l'échantillon sans addition d'étalon interne

Peser 1 g d'échantillon dans un tube de verre de 50 ml à bouchon à vis. Ajouter à l'aide d'une pipette 1 ,0 ml d'acide sulfurique 2 M puis 40,0 ml de mélange eau/éthanol.
Ajouter environ 1 g de granulés régulateurs d'ébullition, fermer le tube et agiter vigoureusement jusqu'à obtention d'une suspension homogène, en aucun cas pendant moins d'une minute. Afin de faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase éthanol, placer le tube dans un bain-marie à 60 °C pendant exactement 5 minutes.
Refroidir le tube immédiatement dans un courant d'eau froide puis conserver l'extrait à 5 °C pendant une heure.
Filtrer l'extrait sur papier filtre. Transférer environ 2 ml de l'extrait dans un flacon échantillon. Conserver l'extrait à 5 °C et procéder au dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance dans les 24 h suivant la préparation de l'extrait.

5.2.3. Préparation de l'échantillon avec addition d'un étalon interne

Peser à trois décimales près 1 g + 0,1 g (a gramme) d'échantillon dans un tube de verre de 50 ml à bouchon à vis. À l'aide d'une pipette, ajouter 1,0 ml d'acide sulfurique 2 M, puis 30,0 ml de mélange eau/éthanol. Ajouter environ 1 g de granulés régulateurs d'ébullition et 10,00 ml de solution d'étalon interne. Fermer le tube et agiter vigoureusement jusqu'à obtention d'une suspension homogène, en aucun cas pendant moins d'une minute.
Afin de faciliter l'extraction des conservateurs dans la phase éthanol, laisser le tube pendant exactement 5 minutes dans un bain-marie à 60 °C.
Refroidir immédiatement le tube dans un courant d'eau froide et conserver à 5 °C pendant une heure.
Filtrer l'extrait sur papier filtre. Transférer 1 ou 2 ml de l'extrait filtré dans un flacon échantillon. Conserver le filtrat à 5 °C et procéder au dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance dans les 24 h suivant la préparation.

5.2.4. Chromatographie en phase liquide à haute performance

Phase mobile: tampon acétate/acétonitrile
Régler le débit de la phase mobile dans la colonne à 2,0 ml/minute ± 0,5 ml/minute. Régler la longueur d'onde du détecteur à 240 nm.

5.2.5. Etalonnage

Injecter 10 ul de chacune des solutions standard de conservateur dans le chromatographe en phase liquide. Etablir les rapports entre les hauteurs de pic des conservateurs à doser et la hauteur du pic de l'étalon interne à partir des chromatogrammes obtenus. Pour chaque conservateur, tracer une courbe reliant ce rapport à la concentration de chaque solution standard.
Vérifier qu'une réponse linéaire est obtenue.

5.2.6. Dosage

Injecter 10 uL d'extrait échantillon dans le chromatographe en phase liquide et enregistrer un chromatogramme. Injecter 10 uL de solution standard de chacun des conservateurs et enregistrer un

chromatogramme. Comparer les chromatogrammes obtenus. Si le chromatogramme de l'extrait échantillon ne présente aucun pic ayant approximativement le même temps de rétention qui l'acide 2-méthoxybenzoïque (étalon interne recommandé), injecter 10 uL d'extrait échantillon avec étalon interne et enregistrer un chromatogramme.
Si l'on observe sur le chromatogramme de l'extrait échantillon un pic interférant ayant le même temps de rétention que l'acide 2-méthoxybenzoïque, il y a lieu de sélectionner un autre étalon interne approprié. Si l'un des conservateurs faisant l'objet de l'investigation ne figure pas sur le chromatogramme, il peut être pris comme étalon interne.

5.3.MI/MCI

ISO 217/TC 217/WG 5 travaille sur le développement d'une méthode basé sur différentes études. **[18]** Les études sont les suivantes :

- Determination of Kathon®CG in products by HPLC and UV detection
  →Kathon®CG and cosmetic products. Rastogi SC, Contact Dermatitis 1990: 22: 155-160.
- Isothiazolinones soluble in water-methanol are extracted and analysed with LC and UV.
  → Determination of isothiazolinones (IT) from products.
- Detection limit 0.2-50 ppm Applications: methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (MCI/MI), 1,2- bensizothiazolin-3-on (BIT), 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (octyl-IT)
  →Henricks-Eckerman M-L, Finnish Institute of Occupational Health, Turku, Finland
- Isothiazolinones soluble in methanol are extracted and analysed with HPLC and variable wavelength diods array spectrophotometer. The detection limits of the isothiazolinones 10-100 ppm. Applications: MCI/MI, BIT, octyl-IT, 2-methyl-4,5- trimethylene-4-isothiazolinone (MTI), 4,5-dichloro-2-noctyl isothiazolinone (DCOI)
  →INRS France Demonstration of isothiazolinones in aqueous fluids

Le dosage sera aussi réalisé par HPLC et le protocole ressemblera surement au protocole de l'acide benzoïque et du benzoate de sodium.

6. Toxicité, évaluation des risques

6.1.Benzoate de sodium

6.1.1. Rapport Santé Canada

A la suite de rapports selon lesquels on aurait trouvé du benzène à l'état de traces dans les boissons, Santé Canada a étudié des boissons rafraîchissantes et d'autres produits à boire afin d'y détecter l'éventuelle présence de cette substance. Le benzène peut se former dans les boissons lorsque l'acide ascorbique se combine avec le benzoate de sodium ou de potassium ainsi que dans certaines conditions, par exemple en présence de chaleur, de lumière ultraviolette ou d'ions métalliques contenus dans les boissons. Des échantillons de 118 différentes boissons rafraîchissantes et autres boissons contenant des benzoates (utilisés comme agent de conservation) ont été analysés en vue d'y mesurer les concentrations de benzène, et les résultats sont présentés dans l'étude intitulée *Enquête sur la présence de benzène dans des boissons non alcoolisées et d'autres produits à boire*.

Dose journalière acceptable jusqu'à **5 mg/kg** de poids corporel par jour pour l'acide benzoïque, les sels de benzoate (calcium, potassium et sodium), le benzaldéhyde, l'acétate de benzyle, l'alcool benzylique et le benzoate de benzyle, exprimée en tant qu'équivalents d'acide benzoïque. **[19]** (Additives)

6.1.2. Exposition humaine

L'exposition de la population à l'acide benzoique ou au benzoate de sodium provient des aliments qui contiennent ces substances naturellement ou ajouté en temps qu'agent antimicrobien.

L'exposition est différente selon les pays, par exemple, au Philippines, la concentration de multiples échantillons montre une concentration comprise entre 20 et 2000 mg/L. A l'opposé d'un pays comme le Japon, qui limite les quantité d'utilisation, la moyenne des produits est comprise entre 50 et 200 mg/L. (Villanueva et al.,1994)

Généralement, l'exposition dépend donc de la consommation personnelle, le choix d'alimentation et les différentes limites imposées par les pays.

Le joint expert comittee on food additives (JECFA) a évaluer la consommation de benzoates à partir d'informations provenant de 9 pays (dont la France) (WHO, 1999).

La catégorie d'aliment contribuant au plus gros apport de benzoate sont les « softs drinks » (boissons gazeuses, boissons fruitées…) pour les pays comme l'Australie, France, UK et les USA. En chine, c'est le Soja en sauce le principal apport, et classé 2 ème au Japon.

La meilleure estimation de la moyenne d'exposition au benzoate est la suivante :

Résultats en mg/kg du poids corporel par jour suivant les limites imposées par les pays :

- Japon = 0,18
- USA = 2,3

Associé à une exposition alimentaire importante, une étude a montré qu'après ingestion d'acide benzoïque et sodium benzoate, il y a une absorption très rapide au niveau de l'appareil gastro-intestinal chez l'homme et l'animal (US FDA, 1972a, 1973). On parle de 100 % d'absorption.

Ces 100 % d'absorption sont a comparer à ce qui se passe au niveau dermique : L'acide benzoique n'est absolument pas entièrement absorbé. On parle de 36 % de la dose appliquée (étude sur 6 humains, Feldmann & Maibach (1970)) (14C-labelled benzoic acid dissolved in acetone; 4 µg/cm2; circular area of 13 cm2; ventral surface of the forearm; non-occlusive within 12 h). L'absorption maximale était de 43 % après 5 jours. Une seconde étude comparable confirme cette tendance (3,400 ou 2000 ug/cm2) avec un pourcentage d'absorption de 35 % après 24 h.

6.2.MIT

6.2.1. Exposition à court terme

L'étude de la toxicité sur le plan du développement réalisée chez le lapin a été choisie pour évaluer les risques d'exposition à court terme par voie cutanée chez les consommateurs. Comme cette étude était inacceptable à des fins réglementaires, il a fallu recourir à une étude de l'exposition par voie orale pour l'évaluation des risques. Cette étude a permis d'observer une diminution de la défécation, du poids corporel et de la consommation alimentaire chez les femelles gravides traitées à la dose de 30 mg/kg p.c./j, ainsi que la présence de zones rouge foncé dans l'estomac. Ces effets s'accompagnaient d'une augmentation de l'incidence d'un effet grave, à savoir des résorptions tardives (accompagnées d'une réduction du nombre de foetus vivants par femelle gravide) survenant à la dose toxique pour la mère. Une DSENO de 10 mg/kg p.c./j a été établie.

6.2.2. Exposition à long terme

En l'absence d'une étude sur la toxicité par voie cutanée à long terme, l'étude sur la toxicité par voie orale de deux ans réalisée chez le rat en utilisant Kathon a été retenue pour évaluer les risques d'une exposition par voie cutanée à long terme en milieux professionnels et résidentiels.

À la dose de 6,6 mg/kg p.c./j, une diminution du poids corporel, du gain de poids corporel et de la consommation alimentaire, de même que différents signes d'irritation au niveau de l'estomac ont été observés chez les deux sexes. Une DSENO de 2,0 mg/kg p.c./j a été établie.

6.2.3. Absorption cutanée

Une étude de l'exposition par absorption cutanée (in vitro) réalisée chez des sujets humains a été présentée. Tel qu'il est mentionné dans la fiche de projet International Harmonization Position Paper on Methodology Issues sous l'égide de l'Accord de libre échange nord-américain (publiée le 18 janvier 1999), les études de l'exposition par absorption cutanée in vitro ne sont pas suffisamment validées pour servir de base à des estimations de l'exposition systémique dans le cadre d'évaluations des risques. Qui plus est, l'étude comportait plusieurs limites qui la rendaient inacceptable. Par conséquent, une valeur d'absorption cutanée de 100 % est recommandée.

6.2.4. Toxicité aigue

Des études de toxicité, le MI est fortement toxique chez le rat pour des concentrations comprises entre 9,69% et 99,7%. Une étude sur la toxicité au niveau du derme pour une concentration de MI à 97,5 % montre une forte toxicité. La LD50 est de 242 mg/kg de poids corporel. Dans une autre étude de toxicité à des concentrations de 9,69 %, le MI est corrosif pour la peau du rat, mais aucune mort n'est observée. La LD50 est alors supérieure à 484,5mg/kg de poids corporel. **[21] [Amended safety of MIT]**

6.2.5. Toxicité chronique

Aucune toxicité n'a été observée quand 97,5 % de MI a été administré à des rats dans une solution buvable d'eau pendant 13 semaines à la concentration de 0, 75, 250, ou 1000 ppm. **[22] [Amended safety of MIT]** (Review)

Chez les animaux de laboratoire, la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one est d'une toxicité aiguë élevée par les voies orale et cutanée et d'une toxicité aiguë modérée par inhalation. La 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one est corrosive pour les yeux et la peau. Elle cause aussi une réaction cutanée allergique. Par conséquent, les mises en garde « DANGER – POISON » ET « CORROSIF POUR LES YEUX ET LA PEAU » devront être inscrites sur l'étiquette. Les préparations commerciales contenant de la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one dont la toxicité aiguë est similaire devront aussi présenter les mêmes mises en garde sur leur étiquette respective. **[23]**

La 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one ne cause pas le cancer chez les animaux, et il est peu probable qu'elle altère le matériel génétique. Rien n'indique que la 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one soit dommageable pour le système nerveux, et les effets nocifs sur le système immunitaire sont peu préoccupants. La 2-méthyl-4-isothiazoline-3-one n'entraîne aucune anomalie congénitale chez les animaux. Toutefois, elle a des effets sur le poids corporel, le gain en poids corporel et la consommation alimentaire. Elle cause aussi une irritation au site de contact (peau, estomac ou cavité nasale et poumons) et modifie légèrement les paramètres sanguins. **[24]**

6.3.Génotoxicité et sodium benzoate

Des cas d'urticaires, asthmes, rhinites ou chocs anaphylactiques ont été décrit après des utilisation orales, dermal ou inhalations de l'acide benzoique ou benzoate de sodium. Les symptômes apparaissent rapidement après l'exposition et disparaissent dans les heures qui suives, et cela même à faible dose.

Les informations concernant les réactions sur la peau sur la population sont encore limitées. Dans une étude regroupant 2045 patients d'une clinique dermatologique, seulement 5 personnes ont eu une réaction positive au patch test. (Brasch et al., 1993), pendant que 34 patients ayant des urticaires de contacts eurent une réaction positive (Broeckx et al., 1987). A partir de cela, il a été conclu que les

réactions cutanées causées par l'acide benzoïque et le benzoate de sodium chez une population en bonne santé sont rares.

Au regard du rapport de l'OECD SIDS sur les benzoates, tandis que l'acide benzoïque est fortement irritant au niveau de la peau, le sodium benzoate est quant à lui non irritant. L'acide benzoïque n'induit cependant pas de sensibilisation chez l'animal, mais on observe une légère incidence de réactions positives aux patchs test chez l'homme. Des données similaires ont été rapporté pour le benzoate de sodium mais les réactions positives observées étaient des urticaires de contact non-immunologiques. **[33]**

Test substance	Subjects	Doses/concentration tested	Procedure	Results
Sodium benzoate	465 patients	NOT stated	NOT stated	Positive reactions (alergenicity) in 1.9% of patients

Tableau 5 : Skin irritaiton and sensitization studies

N'ayant visiblement qu'un très faible pouvoir allergisant, nous allons plutôt évaluer la génotoxicité du benzoate de sodium. Les quantités importantes que l'on consomme par le biais de l'alimentation additionnées à l'utilisation fréquente en cosmétique font du benzoate de sodium un produit fortement génotoxique.

L'activité génotoxique du benzoate de sodium de doit pas être exclu aujourd'hui. **[25]**

*Etude : évaluation de la génotoxicité de 2 conservateurs alimentaires : le benzoate de sodium et benzoate de potassium *1*

Dans cette étude, l'effet génotoxique a été étudié sur des cultures humaines de lymphocytes en utilisant des aberrations chromosomiques, des échanges chromosomiques. Le niveau de dommage ADN nucléaire a aussi été évalué par le test de la comet.

Les études réalisées sur l'activité génotoxique du sodium benzoate montrent des résultats fortement contradictoires. Des effets négatifs ont été observés en utilisant l'Ames test*2, le « tryptophan reversion assay » et le « comet ». A l'opposé, on retrouve des résultats positifs sur « vicia faba », « allium cepa », fibroblastes d'hamsters et sur des cultures de lymphocytes humains.

Résultats, **[26]** :

6.3.1. Essai aberration chromosomique

Le benzoate de sodium induit une augmentation significative de la fréquence de CA's et CA/cellule à toutes les concentrations et périodes de traitement comparé à un contrôle négatif. (Tableau).

Test substance	Treatment		Aberrations							Abnormal cell ± SH (%)	CA/cell ± SH
			Structural						Numerical		
	Period (h)	Concentration (µg/ml)	ctb	csb	cte	f	scu	dic	p		
Control	24	0.00	4	–	–	–	–	–	–	2.00 ± 0.98	0020 ± 0009
MMC	24	0.20	44	14	7	2	1	5	–	32.00 ± 3.29	0365 ± 0034
S. benzoate	24	6.25	11	1	1	–	–	1	–	7.00 ± 1.80*	0070 ± 0018*
		12.5	13	4	1	–	–	1	–	9.50 ± 2.07**	0095 ± 0020**
		25	19	2	1	–	–	1	–	11.50 ± 2.25***	0115 ± 0022***
		50	19	4	–	1	2	2	–	12.00 ± 2.29***	0140 ± 0024***
		100	28	10	–	1	3	3	–	21.50 ± 2.90***	0225 ± 0029***
MMC	48	0.20	90	36	20	2	2	7	–	57.50 ± 3.49	0785 ± 0029
S. benzoate	48	6.25	17	3	–	2	–	–	1	10.50 ± 2.16***	0115 ± 0022***
		12.5	19	2	–	–	–	–	–	10.00 ± 2.12***	0105 ± 0021***
		25	22	4	–	–	1	2	–	13.00 ± 2.37***	0145 ± 0024***
		50	48	9	–	–	2	2	–	27.00 ± 3.13***	0305 ± 0032***
		100	60	18	–	–	1	4	–	36.50 ± 3.40***	0415 ± 0034***
Frequency of abnormalities (%)			73.98	16.47	0.86	1.15	2.60	4.62	0.28		

Tableau 6 : Aberrations chromosomiques sur des cultures de lymphocytes humains traitées avec du benzoate de sodium.

Cette augmentation est dose-dépendante.
L'étude montre différents types d'aberrations de structure : cassures chromosomiques et chromatides, échanges de chromatides, fragmentations…

6.3.2. Echange de chromatides sœurs

Test substance	Treatment		Min–max SCE	SCE/cell ± SE
	Period (h)	Concentration (µg/ml)		
Control	24	0.00	0–6	3.28 ± 0.27
MMC	24	0.20	10–75	34.42 ± 2.67
S. benzoate	24	6.25	2–8	4.34 ± 0.22*
		12.5	2–12	5.58 ± 0.28*
		25	1–13	5.78 ± 0.33*
		50	2–14	7.34 ± 0.38*
		100	3–16	8.46 ± 0.40*
MMC	48	0.20	48–115	84.02 ± 2.37
S. benzoate	48	6.25	2–10	5.50 ± 0.32*
		12.5	2–12	6.10 ± 0.33*
		25	2–14	6.94 ± 0.39*
		50	3–16	8.26 ± 0.47*
		100	3–17	8.96 ± 0.53*

Tableau 7 : Fréquence d'échange de chromatides sœurs dans des cultures de lymphocytes humains traitées avec du Benzoate de sodium.

SB augmente la fréquence de SCE's/cellule. Cette augmentation est significative dans la plupart des concentrations et temps de traitement utilisées et dose dépendante.

6.3.3. Essais micro-noyaux

Test substance	Treatment		Distribution of BN cells according to the no. of MN			MN (%)
	Period (h)	Concentration (µg/ml)	(1)	(2)	(3)	
Control	48	0.00	1	–	–	0.05 ± 0.04
MMC	48	0.20	76	4	2	4.50 ± 0.46
S. benzoate	48	6.25	2	–	–	0.10 ± 0.07
		12.5	6	–	–	0.30 ± 0.12
		25	8	–	–	0.40 ± 0.14*
		50	8	1	–	0.50 ± 0.15**
		100	17	2	1	1.20 ± 0.24***

Tableau 8 : Micronoyaux dans les cultures humaines de lymphocytes traitées au benzoate de sodium.

Montre que le SB augmente la fréquence de lymphocyte avec un micronoyau et de façon significative aux concentrations de 25, 50 et 100 ug/mL et dose dépendant.

6.3.4. Essai comet

Le moment de queue de comète augmente significativement avec toutes les concentrations de SB mais de manière non dose-dépendant.

Test substance	Concentration (µg/ml)	Tail moment (%)
Control	0.00	0.35 ± 0.05
H_2O_2	0.30	4.27 ± 0.91
Sodium benzoate	6.25	1.53 ± 0.33*
	12.5	1.77 ± 0.39*
	25	3.03 ± 0.65*
	50	1.18 ± 0.30*
	100	1.61 ± 035*

Tableau 9 : ADN dommages causés par le SB chez des lymphocytes humains isolés

6.4.Hypersensibilité et MIT

La méthylisothiazolinone (MI) est un allergène émergent dans les cosmétiques, les produits professionnels et ménagers. Une véritable épidémie d'allergie de contact européenne est constatée depuis quelques années avec une prévalence de sensibilisation de contact de 5,6 à 6 % dans les études les plus récentes. Pour ces raisons, le test à la MI vient d'être inclus récemment dans la batterie standard européenne à la concentration de 2000 ppm dans l'eau. Des mesures réglementaires concernant les cosmétiques sont en cours de discussion au niveau européen.

Le mélange méthylchloroisothiazolinone/méthylisothiazolinone (MCI/MI) connu aussi sous le nom commercial de Kathon CG1 a été largement utilisé dans un rapport 3:1 comme agent conservateur dans les années 1980 et a donné lieu à une épidémie de dermatites de contact allergiques en Europe, avec une prévalence variant de 3 à 8 %. Cet allergène a été inclus dans la batterie standard européenne (BSE), à une concentration de 100 ppm et la concentration maximale autorisée d'utilisation de MCI/MI a été abaissée à 15 ppm en Europe dans les produits cosmétiques dès 1989. Ces recommandations ont conduit à une réduction du taux de sensibilisation de contact, mais depuis une dizaine d'années, la prévalence de la sensibilisation de contact au MCI/MI est à nouveau en augmentation atteignant les 4 % en 2011. Cette augmentation s'explique par la réduction de l'utilisation de conservateurs comme les parabens et le formaldéhyde et libérateurs sous la pression des consommateurs au cours des dix dernières années, mais aussi parce que le « successeur » du MCI/MI, le méthyldibromoglutaronitrile a été rapidement interdit dans les cosmétiques dès 2008, en raison de son pouvoir sensibilisant et de l'impossibilité de déterminer une concentration « sûre » d'utilisation.

Dans ce contexte, une alternative au milieu des années 2000 a été d'utiliser la MI seule ou associée à d'autres conservateurs que le MCI, car considérée comme un sensibilisant plus faible que le mélange MCI/MI par les tests réalisés sur le cobaye. **[27]**

6.4.1. Dermatite de contact, Définition

La dermite de contact est une atteinte de la peau causée par le contact de celle-ci avec une substance étrangère. Il existe deux types de dermite de contact : la dermite de contact irritative et la dermite de contact allergique. La dermite de contact irritative, plus fréquente, est causée par diverses substances qui irritent la peau et provoque une inflammation. Dans la dermite de contact allergique, des cellules immunitaires spécifiques sont impliquées et sont sensibilisées à une substance. Ainsi, ces cellules vont s'activer à chaque fois que la peau entre en contact avec cette substance et causer une réaction cutanée.

Symptômes :

Une éruption cutanée à l'endroit de la peau qui a été en contact avec la substance responsable se produit dans les heures ou jours qui suivent l'exposition. L'éruption cutanée est généralement rouge et est accompagnée de démangeaison.

Dans les dermites de contact irritatives, la peau peut sembler plus sèche et fissurée, alors que dans les dermites de contact allergiques, on peut voir des vésicules. Toutefois, la dermite de contact peut être confondue avec plusieurs autres types d'atteinte de la peau, dont la dermite atopique (souvent juste appelée « eczéma »).

6.4.2. Diagnostique

L'allergie de contact est diagnostiquée par le test patch. Durant ce test, le patient est exposé à une série d'allergènes chimiques connues et la réaction chimique est suivie durant 7 jours. L'exposition « recommandée » et le temps de lecture est : Application pendant 2 jours suivie d'une lecture après J2, J3/4 et J7. Les interprétations doivent suivre les indications de l'ICDRG (International Contact Dermatitis Researsh Group) et inclure les réactions négatives, irritantes et donc positives. [28]

Les concentrations utilisées pour les patchs tests sont comprises entre la concentration ou il y a le plus grand nombre de cas d'allergie et la concentration qui cause simplement des irritations.

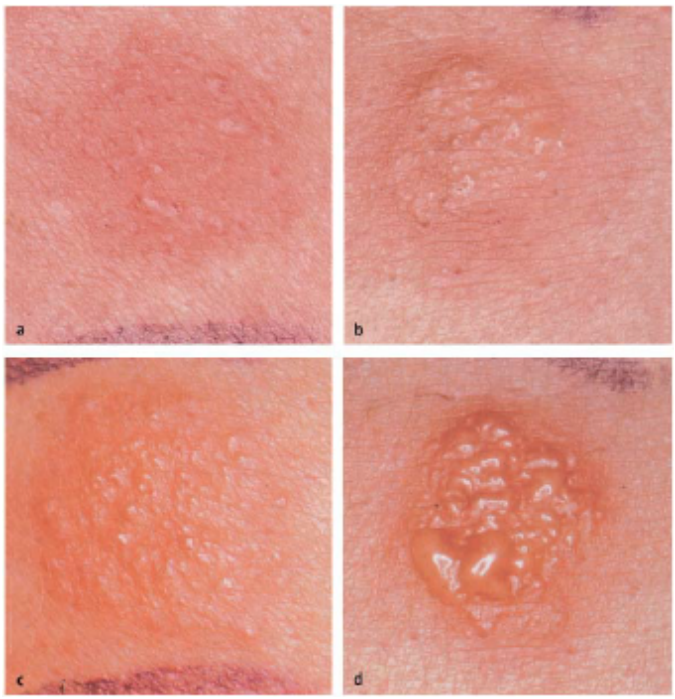


Figure 3 : Réactions positives au patch test (a et b = +, c=++, d=+++)

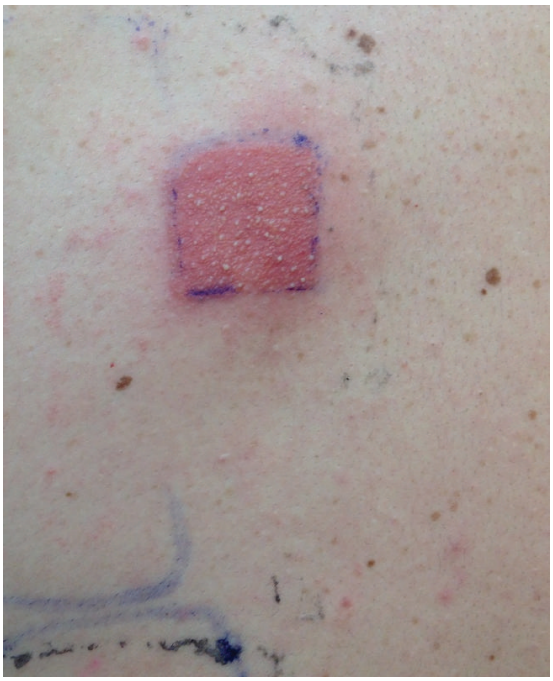


Figure 4 : réaction positive au MI seul par patch test. [**29**] (Katta)

6.4.3. Epidémiologie de l'allergie de contact

Les premiers cas de dermatites de contact allergiques sont rapportés en 1987, puis suite à l'introduction dans les produits industriels en 2000, la MI est publiée en tant qu'allergène de contact professionnel dès 2004 en particulier dans les peintures. Les premiers cas publiés concernant la MI en tant qu'allergène cosmétique sont rapportés en 2010, pour la plupart dans les lingettes, les shampooings, les cosmétiques visage, les déodorants et les produits de protection solaires. Par ailleurs, des cas sévères d'eczéma de contact aéroportés et systémiques en particulier à partir de murs récemment peints ou de nettoyants pour toilette commencent à être publiés dès 2012. Parallèlement à l'augmentation croissante du nombre de cas d'allergie de contact à la MI publiés, une augmentation de la prévalence de l'allergie de contact à la MI/MCI est à nouveau constatée à partir de 2009 en Europe. Cette augmentation ne peut pas être expliquée par un changement d'exposition à la MI/ MCI mais par l'exposition croissante à la MI présente dans des concentrations très proches de 100 ppm dans les produits cosmétiques rincés et non rincés.

Au final en France, une étude a montré que la proportion de tests positifs à la MI a considérablement augmenté de 2010 à 2012 et que, parmi les malades testés pour suspicion d'eczéma de contact allergique, 5,6 % d'entre eux sont actuellement sensibilisés à la MI. Les mêmes constatations on été faites par d'autres études de prévalence en Europe où la MI a été testée en ajout systématique (Tableau 1).

Pays	France	Allemagne	Royaume uni	Danemark	Finlande
Taux de sensibilisation, % (année ou période)	1,5 (2010)	1,9 (2005–2009)	0,5 (2010)	1,4 (2009)	0,9 (2006)
Progression du taux de sensibilisation, % (période)	+4,1 (2010–2012)	+4,1 (2009–2012)	+5,2 (2010–2012)	+1,7 (2006–2010)	+0,9 (2008)
Prévalence en %	5,6 (2012) [13]	6 (2012) [15]	5,7 (2012) [16]	3,1 (2011) [12]	1,8 (2008) [17]
Concentration du test MI (ppm)	200–500	500	500	2000	1000

Tableau 10 : Augmentation du taux de sensibilisation et taux de sensibilisation à la MI dans 5 pays européens.

[30] (Giordano-Labadie)Allergie de contact

Dans les années 1980's, une formulation avec du méthylchloroisothiazolinone (MCI) et du méthylisothiazolinone (MI) fut responsable d'une « épidémie » de dermatite allergique. Pour contrôler ce phénomène, une concentration maximale fut instaurée. Cependant en 2005, le MI seul est introduit dans les produits cosmétiques, et ceci entraine une nouvelle « épidémie » de sensibilisation au MI et MCI/MI.

Une étude rétrospective, consultant les dossiers médicaux de test patch de patients entre 2005 et 2013. MCI/MI a été testé à 100 ppm dans l'eau (TROLAB® patch test allergens) et le MI à 500 ppm.

Résultats :

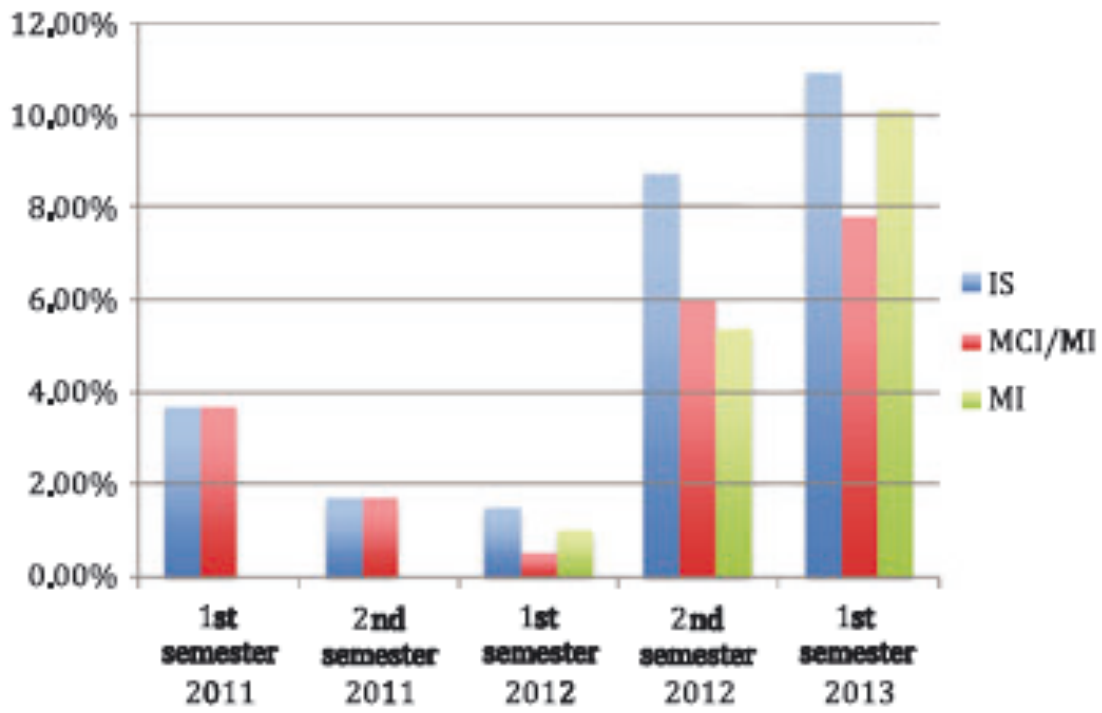


Figure 5 : Réactions positives aux patch tests à la MCI/MI et MI, IS, Isothiazolinone

Le niveau de sensibilisation à l'isothiazolinone a augmenté considérablement depuis 2005. Cette augmentation est très prononcée depuis 2012, date à laquelle le patch test pour le MI a été introduit. La conclusion de cet article est que les concentrations permises de MI devraient être rapidement révisées. [31] (Ana Gameiro)

Une étude récente sur la Sensibilisations professionnelles à méthylisothiazolinone/

Méthylchloroisothiazolinone **[32]** (S. Bădulic) a étudié la fréquence des sensibilisations à MI/MCI, au niveau d'un cabinet de Médecine du travail, ainsi que les possibilités d'éviter le contact avec les sources d'exposition.

Les résultats indique que le biocide utilisé par les peintres ainsi que le savon liquide utilisé par l'infirmière contenant comme préservatifs tant MI que MCI. Des observations similaires dans d'autres pays Européens étant rapportées, l'étude insiste sur le fait qu'une réglementation urgente s'impose pour prévenir de nouveaux cas de sensibilisation et pour protéger les gens déjà sensibilisés.

7. Substitution

L'augmentation de l'utilisation du MI s'explique par la réduction de l'utilisation de conservateurs comme les parabens et le formaldéhyde au cours des dix dernières années, mais aussi parce que le « successeur » du MCI/MI, le méthyldibromoglutaronitrile a été rapidement interdit dans les cosmétiques dès 2008, en raison de son pouvoir sensibilisant et de l'impossibilité de déterminer une concentration « sûre » d'utilisation. Dans ce contexte, une alternative au milieu des années 2000 a été d'utiliser la MI seule ou associée à d'autres conservateurs que le MCI, car considérée comme un sensibilisant plus faible que le mélange MCI/MI par les tests.
Avec la nouvelle réglementation en vigueur et l'interdiction de l'usage du MI dans les produits sans rinçage va pousser les industriels à se tourner vers d'autres conservateurs. La question est de savoir si l'on se dirige vers l'utilisation de nouveaux conservateurs, tout en étant dans l'ignorance totale de potentiels effets allergiques ou autres effets (oestrogénisant…) à court et moyen terme, ou alors ressortir des conservateurs du tiroir comme notamment les parabens. Faut-il craindre le retour des parabens ? Cette disparition annoncée du MIT pose cependant une question : par quoi sera-t-il remplacé ? « La recherche de molécule de substitution est longue et est donc à l'étude au laboratoire et nous ne sommes pas en mesure de vous dire de quoi il s'agira à ce stade », explique Beiersdorf.
Certains annoncent déjà le retour des parabens, à l'image de Bertrand L'Homme, Directeur général de la société Thor Personal Care, spécialiste de la protection microbiologique des formules cosmétiques, lors d'une interview donnée au site Premiumbeautynews.com.
« Dans tous les cas, cela se traduira par une réduction des marges de manœuvre des industriels en matière de protection de leurs formules contre les micro-organismes. »

Les huiles essentielles (de cannelle, lavande, thym, arbre à thé…) ? Elles ne sont pas très efficaces et doivent être employées à hautes concentrations, ce qui peut les rendre irritantes, allergéniques, instables et incompatibles avec le reste des ingrédients.

Climbazole ? Ethyl lauroyle arginate ? Chlorure de cétylpyridinium ? Polyaminopropyl biguanide (PAPB) ? O-phénylphénol et ses sels de sodium et de potassium ?

Le conservateur parfait n'existe toujours pas et n'existera sans doute jamais. En attendant c'est une valse incessante dans le monde des conservateurs avec les retours et les départs multiples de certains d'entre eux.

Conclusion

La protection vis-à-vis des micro-organismes passe donc par addition d'agents antimicrobiens. Ces substances permettent d'éviter la prolifération microbienne qui peut constituer un risque infectieux pour le consommateur de produits cosmétiques et accélérer la détérioration du produit. Pour le fabricant, la contamination microbienne implique des répercussions économiques car elle est suceptible d'entrainer un rejet des lots trouvés contaminés. Ensuite, au cours de l'utilisation, des modifications des caractères organoleptiques et physico-chimiques du produit peuvent survenir, ce qui détourne alors le client de l'achat.

Les mélanges de conservateurs présentent de nombreux avantages comme la possibilité de diminuer la concentration de chaque élément et par la même les éventuels effets secondaires, et augmenter l'efficacité par synergie.

Il apparaît que la saga des cosmétiques n'a pas fini de faire parler d'elle.

Reste à identifier les produits à risque. Depuis 2007, la loi européenne oblige les fabricants de cosmétiques, mais pas de produits ménagers ou professionnels, à mentionner la présence des conservateurs, en toute lettre, sur les emballages des produits cosmétiques. Mais l'obligation ne vaut que pour les boîtes et pas pour les tubes, pots et autres contenants qu'ils entourent.

La MI fait partie à l'heure actuelle des allergènes émergents, elle vient d'être incluse de façon systématique dans la batterie standard européenne et la réévaluation par L'Europe de la sécurité d'emploi de MI dans les cosmétiques est en cours afin d'éviter de nouveaux cas de sensibilisation. Mais il reste encore la problématique de l'utilisation de la MI dans les produits professionnels d'autant plus qu'elle est y actuellement utilisée sans limites réglementaires de concentration. Enfin, il reste à souhaiter que les fabricants utilisant de la MI adoptent les mêmes mesures qu'en Europe pour les pays extra-européens afin d'éviter de nouvelles épidémies annoncées. **[34]**

Bibliographie

[1], [9] : N. Zengin, D. Yüzbasıoglu, F. Ünal, S. Yılmaz, H. Aksoy. «The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate.» Food and Chemical Toxicology (2010).

[2] : Irena Baranowska, Iwona Wojciechowska, Natalia Solarz and Ewa Krutysza. «Determination of Preservatives in Cosmetics, Cleaning Agents and Pharmaceuticals Using Fast Liquid Chromatography.» Journal of Chromatographic Science (2014).

[3] : M, Saltmarsh et Alton, Hampshire, UK Inglehurst Foods Ltd. «Recent trends in the use of food additives in the United Kingdom.» Journal Of The Science Of Food And Agriculture (2014).

[4] : Maria Antonieta Rios Scherrer, Vanessa Barreto Rocha. «Increasing trend of sensitization to Methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (MCI/MI).» An Bras Dermatol (2014).

[5] ; [20] : PRODUCTS, THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC. «Opinion on BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE.» Opinion. EUROPEAN COMMISSION, 2005.

[6] : «Amended Safety Assessment of Methylisothiazolinone as Used in Cosmetics (Draft Tentative Amended Report on Methylisothiazolinone (MI)).» Cosmetic Ingredient Review (2014).

[7] : Review, Cosmetic Ingredient. Amended Safety Assessment of Methylisothiazolinone as Used in Cosmetics . Washington: Cosmetic Ingredient Review , 2014.

[8] [11] [34] : Giordano-Labadie, F. «Méthylisothiazolinone : un allergène émergent .» Revue Française d'allergologie (2014).

[9] ; [10] : DPSN. SANTE CANADA, Directoire des Produits de Santé Naturels. 2014. <www.sc-hc.gc.ca>.

[12] : S.P.Denyer, B.Stewart. «Mechanism of action of desinfectants.» Elsevier (1998).

[13] : Davidson, P.Michael, John N.Sofos et A.L. Branen. Antimicrobial in food . Taylor and Francis group, s.d.

[14] : Anthony V. Qualleya, Joshua R. Widhalma, Funmilayo Adebesinb, Christine M. Kisha, and Natalia Dudareva. «Completion of the core β-oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants.» Proceedings of the National Academy of Sciences (2012).

[15] : Lang, Matthieu. Evaluation du pouvoir allergisant de mélanges complexes. Thèse. Strasbourg: Université de Strasbourg , 2012.

[16] : Irena Baranowska, Iwona Wojciechowska, Natalia Solarz and Ewa Krutysza. «Determination of Preservatives in Cosmetics, Cleaning Agents and Pharmaceuticals Using Fast Liquid Chromatography.» Journal of Chromatographic Science (2014).

[17] : Sixième directive 95/32/CE de la Commission, du 7 juillet 1995, relative aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. JO des communautés européennes , s.d.

[18] : <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/food-aliment/benzene/benzene_hra-ers-fra.php>. standardization, European commitee for. «Preservatives and dyes .» Project group. 2003.

[19] : Additives, WHO/FAO Joint Expert Committee on Food. JECFA, Food Additives Monographs. 2014. <http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpid-bdipsn/refReq.do?id=80&lang=fra>.

[21] ; [22] : Members, Expert Panel. «Amended Safety Assessment of Methylisothiazolinone as Used in Cosmetics.» Cosmetic Ingredient Review (2014).

[23] ; [24] : santé, Division de l'évaluation du danger des produits chimiques pour la santé. SANTE CANADA.

[25] : Davidson, P.Michael, John N.Sofos et A.L. Branen. Antimicrobial in food . Taylor and Francis group, s.d.

[26] : N. Zengin, D. Yüzbasıoglu, F. Ünal, S. Yılmaz, H. Aksoy. «The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate.» Food and Chemical Toxicology (2010).

[27] ; [30] : Giordano-Labadie, F. «Méthylisothiazolinone : un allergène émergent .» Revue Française d'allergologie (2014).

[28] : Lundov, Michael Dyrgaard. «Methylisothiazolinone: Contact Allergy and Antimicrobial Efficacy.» Thèse. National Allergy Research Centre, 2010.

[29] : Katta, Megan J. Schlichte and Rajani. «Methylisothiazolinone: An Emergent Allergen in Common Pediatric Skin Care Products.» Dermatology Research and Practice (2014).

[31] : Ana Gameiro, Ines Coutinho, Leonor Ramos and Margarida Goncalo. Methylisothiazolinone: second 'epidemic' of isothiazolinone sensitization. Coimbra, Portugal: Published by John Wiley & Sons Ltd, s.d.

[32] : S. Bădulic, R. Boari, M.Radu. Sensibilisations professionnelles à méthylisothiazolinone/ méthylchloroisothiazolinone : une expérience roumaine. Poster . Hôpital Clinique «Colentina», Bucarest, Médecine du travail, Dermatologie. Bucarest, 2014.

[33] : Members, Expert Panel. «Amended Safety Assessment of Benzyl alcohol and Benzoic acid and its salts and benzyl Ester.» Cosmetic Ingredient Review (2011).

Résumé

Avec l'augmentation de la production de produits cosmétiques, les conservateurs sont devenus une pratique de plus en plus importante dans la technologie cosmétique moderne. Les conservateurs permettent la durabilité et la protection contre la croissance bactérienne et les moisissures qui causent la dégradation du produit cosmétique.
Différentes études montrent que l'alcool benzyl, l'acide benzoique et ses sels et l'ester benzyl sont sûrs dans la pratique courante, tout comme les concentrations décrites dans cette évaluation de sécurité. Ce n'est pas le cas pour le Méthylisothiazolinone. Au mars 2013, la réunion du Comité CIR d'experts, le jury a passé en revue les données cliniques indiquant une fréquence attendue des individus qui ont des réactions allergiques au conservateur MI trop élevé. Des rapports récents ont montré une augmentation de la sensibilisation tant à MCI/MI QU'À MI isolément. En 2010, le Comité d'experts a publié le rapport final de l'évaluation de sécurité de méthylisothiazolinone (MI) avec la conclusion que "MI est sûr pour l'utilisation dans des formulations cosmétiques aux concentrations jusqu'à 100 ppm (0.01 %). Le règlementation est entrain de changer, en fait le mélange" peut être utilisé sans risque dans les produits rincés à une concentration ne devant pas excéder 15 ppm.
Malgré le contrôle de la production de cosmétique et le retrait de la composition de substances causant des réactions défavorables chez certaines personnes, des composés nuisibles trouvés dans les cosmétiques posent toujours un problème majeur. Il s'avère même que l'allergie aux composants cosmétique augmente. Pour ne pas remplacer des substances retirées fortement allergènes, avec de nouvelles qui entrainent aussi des effets secondaires tels des allergies, la cosmétique devraient être constamment contrôlées.

Abstract

With the increase in the cosmetics production, preservatives have become an increasingly important practice in modern cosmetic technology. Preservatives provide durability and protection against the growth of bacteria and fungi that cause cosmetics to decay.
After reviewing the available data in the present report, it was concluded that benzyl alcohol, benzoic acid, and its salts and benzyl ester are safe in the present practices of use and concentration described in this safety assessment. It’s not the same things for the MI. At the March 2013 CIR Expert Panel meeting, the Panel reviewed newly provided clinical data indicating a higher than expected frequency of individuals who have allergic reactions to the preservative MI. Recent reports have shown an increase in sensitization to both MCI/MI and MI by itself. In 2010, the Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel published the final report of the safety assessment of methylisothiazolinone (MI) with the conclusion that “MI is safe for use in cosmetic formulations at concentrations up to 100 ppm (0.01%). The reglementation is changing, in fact the mixture “may be safely used in ‘rinse-off’ products at a concentration not to exceed 15 ppm.
Despite the control of the production of cosmetics and withdrawal of the composition of substances causing adverse reactions in people, harmful compounds found in cosmetics still pose a major problem. It even turns out that allergy to components of cosmetic disease is increasing. In order not to replace withdrawn, highly allergenic substances, with new ones which also cause adverse side effects, allergies to cosmetics should be constantly monitored.